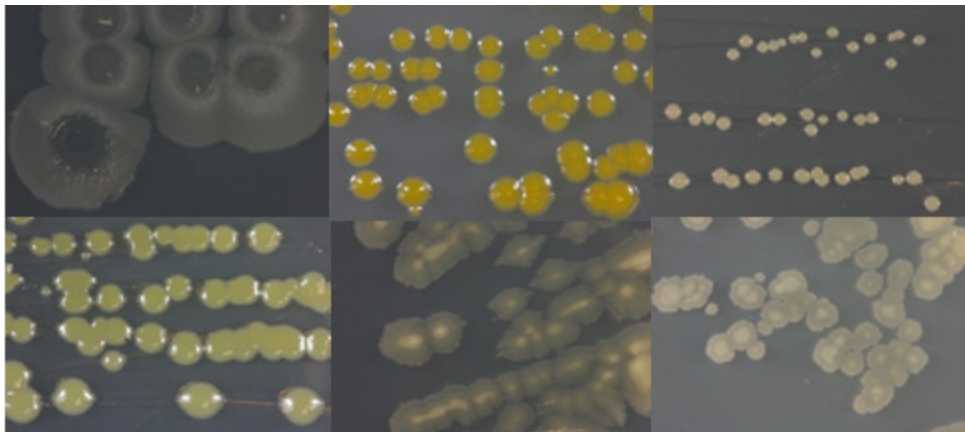

Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje

Morfología colonial de bacterias lipolíticas estudiadas



Trabajo Fin de Grado Ciencias Ambientales. 2014

Andrés Ruiz Arcos

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

**“Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos
aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje”**

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentado por el alumno de Grado en
Ciencias Ambientales Andrés Ruiz Arcos.

En Almería a 7 de julio de 2014

Directores:

Joaquín Moreno Casco
Catedrático de Microbiología
Departamento de Biología y Geología
Universidad de Almería

María José López López
Profesora Titular de Microbiología
Departamento de Biología y Geología
Universidad de Almería

Agradecimientos

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado he contado con el apoyo y colaboración de varias personas a las que me gustaría agradecerles la ayuda y orientación sin la que no hubiese sido posible la elaboración de este trabajo.

Agradecer a los directores de este proyecto, Joaquín Moreno Casco y en especial a M^a José López López por el tiempo, dedicación, experiencia y conocimiento que me han aportado a lo largo del desarrollo de este trabajo. Muchísimas gracias.

A Carmen, Macarena, Maria José, Paqui y Marisol que me han ayudado cuando lo he necesitado y que, sin ellas, la realización de este trabajo hubiese sido mucho más difícil.

Y para finalizar, gracias a mi madre María Araceli por haberme financiado los estudios durante estos cinco años.

Una vez más, Gracias a todos.

Trabajo Fin de Grado

Alumno: Andrés Ruiz Arcos

Título: Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje.

Resumen

El compostaje de residuos vegetales es en la actualidad la mejor alternativa para el tratamiento de dichos residuos reduciendo el impacto ambiental generado en comparación con otros sistemas de tratamiento. Los elementos clave en este proceso son la materia orgánica de partida y la microbiota encargada de transformar la materia vegetal en un producto estable aplicable como sustrato o enmienda orgánica para la agricultura. Sin embargo y a pesar de la importancia de estos, existen pocos trabajos que estudien de forma exhaustiva la microbiota presente en el proceso de compostaje o las capacidades potenciales de los microorganismos del proceso de compostaje en diferentes áreas.

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado un cultivo y puesta en producción de bacterias con actividad lipolítica previamente seleccionadas a partir de residuos vegetales hortícolas sometidos a compostaje y se realizó una cuantificación de la enzima lipasa producida por dichos microorganismos bajo condiciones controladas.

La mayoría de bacterias de la colección estudiada pertenecieron al género *Bacillus* (71,42%) con presencia de otros géneros como *Chryseomicrobium*, *Staphylococcus*, *Chelatococcus*, *Brevundimonas*, *Parapusillimonas* y *Citrobacter* con una presencia en la colección del 4,76% para cada una. Los valores de producción obtenidos fueron en general bastante bajos no superando valores de 0,04 U/mL, destacando tres cepas por sus niveles de producción, *Bacillus altitudinis* 975 y *Staphylococcus equorum* 557, ambas con una producción de alrededor de 0,1 U/mL y *Parapusillimonas granuli* 701 con 0,13 U/mL presentando un gran potencial para la producción de lipasas de interés ambiental e industrial.

El estudio realizado contribuirá en el avance del conocimiento de los microorganismos presentes en el compostaje permitiendo la selección y utilización de estos para su aplicación en biotecnología dado el potencial existente demostrado.

Índice

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	2
2.1. Compostaje y microorganismos	2
2.1.1. Definición y etapas	2
2.1.2. Microorganismos del proceso de compostaje.....	4
2.2. Lipasas microbianas.....	8
2.2.1. Características generales y microorganismos productores.....	8
2.2.2. Aplicaciones.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Colección de microorganismos y mantenimiento	12
3.2. Identificación	15
3.3. Producción y cuantificación de lipasas	16
3.3.1. Producción de lipasas.....	16
3.3.2 Cuantificación de la actividad lipasa.....	17
3.4. Análisis de datos	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Identificación de microorganismos lipolíticos	21
4.2. Producción de lipasa	25
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. Justificación y objetivos

Durante las últimas décadas grandes extensiones del litoral andaluz, y en particular de Almería, se han dedicado a la agricultura intensiva bajo plástico. Esta actividad permite obtener una elevada producción en un reducido lapso de tiempo y espacio. Este modo de agricultura constituye el principal recurso económico de la provincia en la actualidad, con una producción que es exportada a toda Europa pero que adicionalmente ha provocado una fuerte problemática ambiental. Una consecuencia negativa directa de dicha actividad es la generación de grandes cantidades de residuos tales como plásticos y restos vegetales cuya gestión adecuada supone un reto para la agricultura intensiva bajo plástico. En particular los restos vegetales constituyen un riesgo en las fases productivas debido a que actúan como focos de plagas cuando se acumulan sin control. Dichos residuos incluyen los restos de las plantas retirados durante la fase productiva y al final de la campaña, además de frutos no comercializables. En la práctica estos restos suelen estar acompañados por otros materiales no biodegradables difíciles de eliminar, tales como restos de plásticos y rafias, siempre presentes en el volumen final de residuo y que dificultan su tratamiento final.

El compostaje de los residuos vegetales constituye la mejor alternativa en la actualidad para el tratamiento de dichos residuos. Este tratamiento tiene un reducido impacto ambiental en comparación con otros sistemas de tratamiento y, adicionalmente, permite produciendo un riesgo ambiental mínimo y haciendo que el residuo se revalorice conformando un producto final de calidad. Los agentes principales en dicho proceso son los microorganismos, que transforman la materia orgánica inicial hasta transformarla en un producto estable aplicable como enmienda para suelos agrícolas. Sin embargo, a pesar del potencial que tiene el estudio de la microbiota asociada al compostaje, existen pocos estudios que aprovechen las capacidades potenciales inherentes a estos microorganismos.

El **principal objetivo** de este **Trabajo de Fin de Grado** es analizar la capacidad de microorganismos asociados al proceso de compostaje para producir lipasas. Estas enzimas presentan numerosas aplicaciones ambientales en procesos de biodescontaminación, y biotecnológicas tales como la producción de biodiesel o de polímeros biodegradables. En el Trabajo de Investigación se analiza la capacidad para producir dichas enzimas por parte de una colección de microorganismos aislados a partir de materiales vegetales sometidos a compostaje. Estos microorganismos fueron seleccionados en estudios previos por su capacidad para expresar la actividad lipasa, sin embargo, se desconoce la cantidad de enzima que son capaces de producir. En este TFG se identificarán dichos microorganismos y se cuantificará la actividad de la enzima.

Este estudio contribuirá al avance en el conocimiento del compostaje así como permitir la selección de microorganismos con aplicación potencial en biotecnología.

2. Antecedentes bibliográficos

2.1. Compostaje y microorganismos

2.1.1. Compostaje: Definición y etapas

El compostaje es una de las mejores opciones para el tratamiento de residuos orgánicos derivados de la agricultura, ya que es un proceso amigable con el medio ambiente, revaloriza diferentes tipos de residuos orgánicos, y el producto final puede ser utilizado como enmienda para suelos, permitiendo a la vez el reciclado de residuos (de Guardia et al., 2010; Vargas-García et al., 2010). Dicho proceso está documentado desde el siglo I d.C. (Holgado et al., 1988). Desde entonces, la puesta en práctica del proceso de degradación de residuos orgánicos para la posterior utilización del producto resultante ha sido utilizada por los agricultores. Sin embargo, la falta de control sobre el proceso resultaba en la obtención de un producto con carencias nutricionales. En la actualidad, el control tanto de la fase de producción (compostaje) como del producto final (compost) se hace necesario para asegurar una óptima calidad y mínimos costes (Fitzpatrick et al., 2005).

Existen numerosas definiciones de compostaje, siendo una de las mas aceptadas la siguiente: *“la descomposición biológica aeróbica de restos orgánicos en condiciones controladas”* (Abad et al., 2002; Bertran et al., 2004). Sin embargo, esta definición carece de una descripción del proceso, por lo que cabe destacar también la más explícita descrita en el Real Decreto 824/2005 de julio sobre productos fertilizantes y afines (BOE 171 de 19/07/2005), en el que se define el compostaje como *“proceso controlado de transformación biológica aeróbica y termófila de materiales orgánicos biodegradables que da lugar a los tipos de enmiendas orgánicas, cuyas características se detallan en el grupo 6 del anexo del mencionado Real Decreto”*. Las características básicas que deben tener los productos obtenidos, denominados compost, incluyen un contenido mínimo en humedad entre 30 y 40%, materia orgánica entre 35 y 40% y una relación C/N de 15-20, con variaciones dependientes de los sustratos utilizados.

Los encargados de llevar a cabo el proceso de compostaje, la transformación y la estabilización de la materia orgánica son los microorganismos (Tang et al., 2004) que se suceden en un entorno cambiante (Kuok et al., 2012).

Desde el punto de vista operacional, para que un proceso de compostaje tenga lugar, en primer lugar deben seleccionarse materiales orgánicos que suministren nutrientes carbonados, nitrogenados y otros elementos necesarios para que los microorganismos presentes en dichos materiales proliferen. Para ello es preciso además humectar y triturar dichos sustratos para facilitar el ataque microbiano. Una vez adecuados, los materiales se apilan y en estas condiciones comienzan a desarrollarse los microorganismos degradando la materia orgánica en presencia de oxígeno y generando calor. Las variaciones térmicas que ocurren en la pila, conjuntamente con otras modificaciones ocasionadas también por la actividad microbiana dan lugar a una sucesión de poblaciones con diferentes actividades metabólicas y tolerancia térmica que

conducen a la estabilización de la materia orgánica generando un producto rico en humus (Moreno y Mormeneo, 2011).

La pila de compostaje se conforma como un ecosistema en el que diferentes poblaciones microbianas constituidas por hongos y bacterias degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno dando lugar a un producto estable y humificado junto a gases, agua y calor generados como consecuencia del metabolismo microbiano. La predominancia de determinados microorganismos se verá influida por las condiciones tanto nutricionales como ambientales que se dan durante el proceso. De este modo, el compostaje es una interacción compleja dada entre un sustrato conformado por restos orgánicos, microorganismos, aireación y producción de calor. El conocimiento de la influencia de estos parámetros sobre los ecosistemas microbianos y viceversa permitirá su manejo adecuado, lo que conducirá a una mayor eficiencia, con la posibilidad de poder controlarlo. Este control debe ir orientado tanto a la aceleración de la transformación de la materia orgánica como a la minimización de cualquier riesgo medioambiental (Moreno y Mormeneo, 2011).

Un proceso de compostaje típico se desarrolla en diferentes etapas que se distinguen entre sí por las variaciones térmicas del material y las reacciones metabólicas predominantes (Figura 1). Así, se reconocen cuatro fases: una fase inicial mesófila en la que el material comienza a calentarse, ascendiendo su temperatura desde los 10 a los 42°C; una segunda fase, denominada fase termófila, en la que se alcanzan rangos de temperaturas entre los 45 y los 70°C; una tercera fase, llamada fase de enfriamiento o segunda fase mesófila, en la que la temperatura vuelve a descender; y una cuarta fase, denominada fase de maduración, en la que la temperatura no varía y el material termina de estabilizarse. Alternativamente el proceso se puede dividir en dos fases globales diferenciadas por la actividad microbiana y sustrato disponible. Estas fases son: fase bio-oxidativa o de crecimiento activo de los microorganismos, en la cual existe una elevada disponibilidad de nutrientes y amplias variaciones térmicas; y fase de maduración, en la que la disponibilidad de nutrientes es limitada y la actividad microbiana es menos protagonista (Figura 1). De acuerdo con este esquema, la fase bio-oxidativa está a su vez diferenciada en varias fases termófilas/mesófilas (Moreno y Mormeneo, 2011). Éstas se suceden mediante operaciones de volteo, las cuales permiten, además de oxigenar el material, incorporar sustrato sin biodegradar en el interior de la pila, provocando un nuevo ascenso térmico. Por el contrario, la temperatura decrece debido al agotamiento de compuestos fácilmente biodegradables, lo que ocasiona una disminución de la actividad microbiana. Las variaciones de temperatura dan lugar a una sucesión en el tiempo de distintas poblaciones microbianas mesófilas, que proliferan entre los 10 y 40°C, y termófilas, con crecimiento entre los 40 y 70°C (Moreno y Mormeneo, 2011). Una vez finaliza el proceso se obtiene un producto humificado estable, en el que los microorganismos ya no pueden descomponer más materia orgánica, o lo hacen de forma muy lenta.

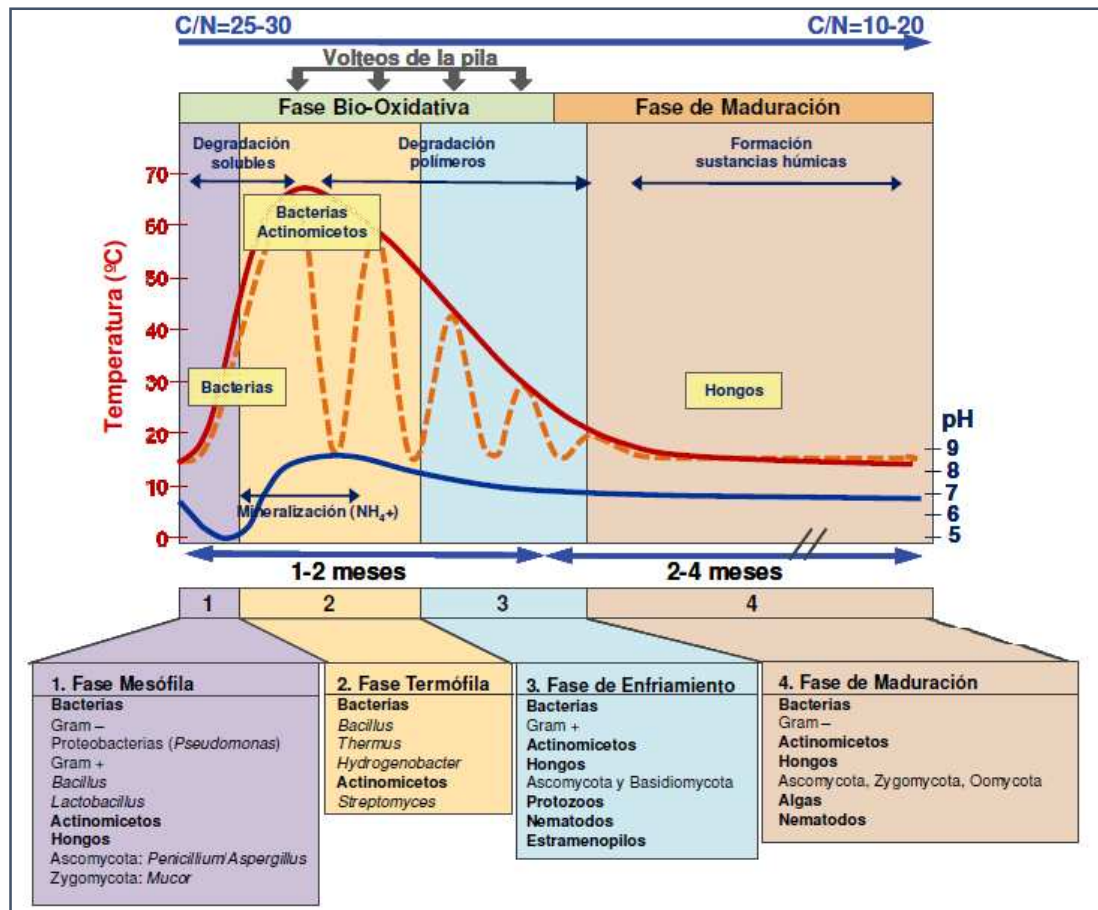


Figura 1. Evolución del proceso de compostaje según diferentes parámetros (Moreno y Mormeneo, 2011)

Los compuestos orgánicos solubles son los más fácilmente biodegradables y constituyen la primera fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano (Said-pulicino et al., 2007). Sin embargo, los nutrientes principales en residuos orgánicos son polímeros como la celulosa, lignina y proteínas, cuya metabolización es más difícil. Estos polímeros son hidrolizados por enzimas microbianas extracelulares, que dan lugar a la liberación de los monómeros constituyentes (azúcares, aminoácidos, etc.), los cuales son fácilmente metabolizables (Vargas-García et al., 2010). De esta forma, la materia orgánica constituida principalmente por polímeros es transformada en una materia más estable denominada fracción húmica (López et al., 2002; Huang et al., 2010).

2.1.2. Microorganismos del proceso de compostaje

El conocimiento de la microbiota implicada en el compostaje puede ayudar a mejorar dicho proceso, tanto en lo concerniente a su desarrollo, como en la calidad de los productos finales. La mayoría de los estudios de comunidades microbianas del compostaje se han llevado a cabo mediante la aplicación de técnicas convencionales que implican cultivo en medios complejos orgánicos, incluyendo en algunos casos extractos obtenidos a partir

del compost (Dees y Ghiorse, 2001; Anastasi et al., 2005; Chandna et al., 2013). En la última década se han aplicado técnicas de biología molecular y de análisis de biomarcadores químicos, muchos de los cuales no requieren cultivar los microorganismos, y que han permitido detectar numerosas especies no descritas previamente en procesos de compostaje (Partanen et al., 2010; de Gannes et al., 2013).

La diversidad microbiana es un prerequisite para el compostaje satisfactorio de cualquier sustrato. Durante el mismo se desarrolla una gran variedad de microorganismos aerobios mesófilos, termotolerantes y termófilos que incluyen bacterias, entre las que destacan los actinomicetos, y hongos. Algunos estudios puntuales han detectado también la presencia de arqueas (Moreno y Mormeneo, 2011).

En cada proceso se pueden encontrar distintos microorganismos dependiendo de los sustratos, el tipo de operación del proceso y las condiciones ambientales externas. Esto dificulta generalizar un patrón de diversidad microbiana para el compostaje. Ryckeboer et al. (2003) realizaron un inventario exhaustivo de los microorganismos detectados en diferentes procesos de compostaje mediante técnicas que implican cultivo. En dicho trabajo se contabilizaron un total de 155 especies distintas de bacterias, 33 de las cuales eran actinomicetos, pertenecientes a 66 géneros diferentes (Tabla 1) y 408 especies de hongos, incluidos en 160 géneros distintos (Tabla 2). Esta ingente cantidad de información se amplía cada día, apareciendo nuevos microorganismos asociados al compostaje. No obstante, se asume que el conocimiento de la microbiota del compostaje aún es limitado, ya que incluso los resultados obtenidos aplicando las técnicas moleculares más avanzadas no dan cuenta del total de las poblaciones microbianas asociadas al proceso (Schloss et al., 2005).

Tabla 1. Géneros procariotas detectados en compostaje (Moreno y Mormeneo, 2011)*

Dominio Bacteria						
Phylum Proteobacteria						
alfa-proteobacterias						
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Xanthobacter</i>		
<i>Brevundimonas</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Rhodovulum</i>			
Beta-proteobacterias						
<i>Achromobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Variovorax</i>		
<i>Acidovorax</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Paucimonas</i>			
Gamma-proteobacterias						
<i>Acinetobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pseudoaltermonas</i>	<i>Serratia</i>	
Phylum Firmicutes						
Bacilli						
<i>Amphibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Thermoactinomyces</i>		
<i>Bacillus</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>			
Clostridia						
<i>Clostridium</i>	<i>Desulfotomaculum</i>					
Phylum Bacteroidetes						
<i>Bacteroides</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>		
Phylum Actinobacteria						
<i>Actinomyces</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Terrabacter</i>	<i>Thermomonospora</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Thermobifida</i>	<i>Thermopolyspora</i>
<i>Cellulomonas</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rathayibacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Thermocristum</i>	<i>Symbiobacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>						
Phylum Deinococcus-Thermus						
<i>Thermus</i>						
Phylum aquificae						
<i>Hydrogenobacter</i>						
Dominio Archaea						
<i>Methanothermobacter</i>						

*Clasificación de acuerdo con The Taxonomicon & Systema Naturae 2000: Brands, S.J. (comp.) 1989-2005. Systema Naturae 2000. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. [<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/>]

Tabla 2 Géneros de eucariotas microbianos detectados en compostaje (Moreno y Mormeneo, 2011)*

Reino Fungi						
Clase Ascomycetes						
<i>Acremonia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Eremascus</i>	<i>Hormiscium</i>	<i>NEC tria</i>	<i>Prusia</i>	<i>Tabella</i>
<i>Acrimonia</i>	<i>Cephalophora</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Humicola</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>Pseudallescheria</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Acrophialophora</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Eutypella</i>	<i>Hypocrea</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Pseudogymnoascus</i>	<i>Thermoascus</i>
<i>Aleurisma</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Hypomyces</i>	<i>Oedocephalum</i>	<i>Pullularia</i>	<i>Thermomyces</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Chrysosporium</i>	<i>Fennellia</i>	<i>Leptographium</i>	<i>Oidiodendron</i>	<i>Rhinocladia</i>	<i>Thielavia</i>
<i>Aphanascus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Macrosporium</i>	<i>Oidium</i>	<i>Rollandina</i>	<i>Thielaviopsis</i>
<i>Apiospora</i>	<i>Clonostachys</i>	<i>Gelasinospora</i>	<i>Malbranchea</i>	<i>Oospora</i>	<i>Scedosporium</i>	<i>Thysanophora</i>
<i>Arthrinium</i>	<i>Contothyrum</i>	<i>Geomyces</i>	<i>Melanocarpus</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Scolecobasidium</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Arthrobotrys</i>	<i>Coonemeria</i>	<i>Geosmithia</i>	<i>Metarhizium</i>	<i>Papulaspora</i>	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Trichocladium</i>
<i>Ascodesmis</i>	<i>Corynascus</i>	<i>Gilmaniella</i>	<i>Microascus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Scytalidium</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Ascotricha</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Gliobotrys</i>	<i>Mollisia</i>	<i>Peziza</i>	<i>Sepedonium</i>	<i>Trichophaea</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Cylindrocarpum</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Monilia</i>	<i>Phialemonium</i>	<i>Sordaria</i>	<i>Trichothecium</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Dactylaria</i>	<i>Gliomastix</i>	<i>Moniliella</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Spicaria</i>	<i>Trichurus</i>
<i>Beauveria</i>	<i>Doratomyces</i>	<i>Graphium</i>	<i>Monotospora</i>	<i>Phoma</i>	<i>Sporothrix</i>	<i>Ulocladium</i>
<i>Botryosporium</i>	<i>Emericella</i>	<i>Gymnoascacea</i>	<i>Myceliophthora</i>	<i>Phomopsis</i>	<i>Stachybotrys</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Botryotinia</i>	<i>Engyodontium</i>	<i>Harpographium</i>	<i>Mycogone</i>	<i>Pithomyces</i>	<i>Staphylotrichum</i>	<i>Volutella</i>
<i>Botryotrichum</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Heterosporium</i>	<i>Myrothecium</i>	<i>Plectosporium</i>	<i>Stemphylium</i>	<i>Westerdykella</i>
Clase Saccharomycetes						
<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Pichia</i>			
Clase Basidiomycetes						
<i>Agaricus</i>	<i>Coprinus</i>	<i>Lentinus</i>	<i>Mycena</i>	<i>Pleurotus</i>	<i>Sporotrichum</i>	<i>Trametes</i>
<i>Armillaria</i>	<i>Fomes</i>	<i>Lenzites</i>	<i>Panaeolus</i>	<i>Sistotrema</i>	<i>Stereum</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Clitopilus</i>	<i>Gloeophyllum</i>					
Clase Urediniomycetes						
<i>Rhodotorula</i>						
Clase Zygomycetes						
<i>Absidia</i>	<i>Circinella</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Piptocephalis</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Zygorhynchus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhizomucor</i>	<i>Stylopaga</i>	<i>Syncephalis</i>	
Reino Chromista						
Clase Oomycetes (Reino Chromista)						
<i>Pythium</i>						

*Clasificación de acuerdo con "Catalogue of Life 2005" (http://annual.sp2000.org/2005/info_about_col.php). Species 2000 and the Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

Cada etapa del compostaje está caracterizada por el dominio de un determinado grupo microbiano (Moreno y Mormeneo, 2011) (Tabla 1 y 2). A continuación se describen los microorganismos característicos de cada una de las fases del proceso de compostaje.

Componentes iniciales

La microbiota inicial de los materiales a compostar es muy variable y depende del tipo de sustrato y condiciones de almacenaje del mismo previo a su compostaje. Generalmente se suele encontrar un predominio de hongos cuando los materiales se conservan en condiciones secas. Sin embargo, la composición de la población inicial no constituye un factor limitante para que se desarrolle el proceso, ya que una vez adecuado el material (humectado, triturado y mezclado), los microorganismos del propio sustrato proliferan y a ellos se incorporan microorganismos del entorno circundante a la pila (Moreno y Mormeneo, 2011).

Fase mesófila inicial

La fase mesófila inicial es la parte más dinámica del compostaje, inicialmente los sustratos están a temperatura ambiente y comienzan a actuar bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes que utilizan rápidamente sustancias carbonadas solubles y de fácil degradación (azúcares y aminoácidos). Las bacterias con metabolismo oxidativo y fermentativo, son las que alcanzan mayores niveles en esta fase, principalmente bacterias Gram negativas y productoras de ácido láctico, que crecen rápido a expensas de compuestos fácilmente degradables (Moreno y Mormeneo, 2011). Aunque la riqueza de especies fúngicas es baja respecto a la de bacterias, la dinámica poblacional sigue un patrón muy parecido al de estas.

Fase termófila

En la fase termófila proliferan exclusivamente microorganismos termotolerantes y termófilos tales como actinomicetos (*Thermoactinomyces* sp.) diversos *Bacillus* termófilos y bacterias Gram negativas como *Thermus* e *Hydrogenobacter*. Los microorganismos no termotolerantes, incluyendo patógenos y parásitos, son inhibidos durante esta fase. Los hongos y levaduras son reducidos notablemente desde el inicio de la fase termófila y son eliminados completamente a partir de los 60°C (Moreno y Mormeneo., 2011).

En las etapas iniciales de esta fase la microbiota mesófila es inhibida por la temperatura, mientras que las poblaciones de termófilos no se desarrollan de forma adecuada porque aún no se ha alcanzado su rango óptimo de temperatura. Por ello, existe una cierta ralentización en el aumento de la temperatura respecto al incremento de la fase anterior. Una vez alcanzado cierto número de microorganismos termófilos el ritmo de incremento de temperatura se recupera (Moreno y Mormeneo., 2011). Con el aumento de temperatura se observa un descenso en la biodiversidad.

Durante esta fase, una vez agotados los nutrientes más simples y de fácil degradación, comienzan a predominar los actinomicetos, en particular estreptomicetos que, junto con algunos *Bacillus*, comienzan a degradar proteínas, incrementando la liberación de amoníaco con la consiguiente alcalinización del medio. Durante esta fase también se ha observado la metabolización de moléculas como la lignocelulosa (Tuomela et al., 2000). Como consecuencia de la degradación de dichos polímeros se liberan nuevas sustancias monoméricas simples que pueden ser utilizadas por otros microorganismos. La actividad microbiana, por lo tanto, sigue incrementándose hasta superar los 60°C. A temperaturas superiores a 60°C, la degradación es realizada exclusivamente por bacterias termófilas. Las bacterias no esporuladas *Hydrogenobacter* y *Thermus* junto con algunas esporuladas pertenecientes al género *Bacillus* predominan a valores térmicos de 70 a 82°C (Beffa et al., 2000). Por encima de los 60°C, el calor *per se* inhibe a los microorganismos, pero también actúa limitando el suministro de oxígeno, dado que la solubilidad de este decrece con el aumento de la temperatura. Esto provoca una disminución de la actividad microbiana y, como consecuencia, una caída en la temperatura. Así, la tercera fase o fase de enfriamiento, se inicia cuando la temperatura es elevada y la fuente de carbono, directamente disponible, comienza a ser un factor limitante.

Fases de enfriamiento y maduración

Las etapas de enfriamiento y maduración finales están caracterizadas por el crecimiento de una nueva comunidad mesófila diferente a la de la fase mesófila inicial. En esta comunidad predominan hongos y actinomicetos capaces de degradar compuestos complejos. Estos microorganismos recolonizan el material desde el entorno circundante, los bordes de la pila o bien proceden de la germinación de esporas que resistieron la fase termófila. Aunque las bacterias mesófilas se encuentran en bajo número en estas fases, su diversidad es mayor que en las fases anteriores y presentan nuevas actividades importantes para la maduración del compost (Moreno y Mormeneo, 2011). Estas bacterias no sólo están implicadas en la oxidación de la materia

orgánica, sino que también participan en la oxidación del hidrógeno, amonio, nitrito y sulfuros, en la fijación de nitrógeno, reducción de sulfatos, producción de exopolisacáridos y producción de nitrito a partir de amonio bajo condiciones heterotróficas (Díaz-Raviña et al., 1989; Beffa et al., 1996).

Conforme avanza la maduración, la comunidad se hace más estable y compleja, y con una composición que se asemeja bastante a la de los suelos, apareciendo microorganismos típicos de dicho hábitat como *Arthrobacter* (Moreno y Mormeneo, 2011). A la actividad de hongos y bacterias durante la maduración se suma la de otros organismos como los protozoos, nemátodos y miriápodos, que contribuyen a la degradación y estabilización final de la materia orgánica.

2.2. Lipasas microbianas

2.2.1. Características generales y microorganismos productores

Las enzimas son catalizadores naturales producidos por plantas, animales y microorganismos aunque la mayoría de enzimas actualmente comercializadas proceden de microorganismos (Hassan et al., 2006). Dichos compuestos de naturaleza proteica permiten realizar transformaciones específicas y con menor coste energético o impacto ambiental que procesos químicos alternativos (Hasan et al., 2006). Las enzimas microbianas presentan numerosas ventajas respecto a las derivadas de plantas o animales entre las que destacan las siguientes: los microorganismos tienen una gran variedad de actividades catalíticas; pueden generar grandes cantidades de enzima mediante cultivo, son susceptibles de manipulación genética con mayor facilidad que otros organismos superiores y se pueden conseguir microorganismos hiperproductores o con enzimas más eficaces; permiten un suministro regular de enzima debido a que, como la producción se realiza en condiciones controladas en reactores, no está sometida a fluctuaciones estacionales; los microorganismos tienen un rápido crecimiento y en medios de bajo coste (Posorske et al., 1984). Las enzimas microbianas, además, son más estables que las correspondientes obtenidas de plantas o animales y su producción es más conveniente y segura (Wiseman, 1995).

Los lípidos constituyen una gran parte de la biomasa de la tierra y las enzimas lipolíticas juegan un importante papel en la transformación de dichos polímeros insolubles en agua. Las enzimas lipolíticas o lipasas están involucradas en la hidrólisis, descomposición y movilización de lípidos (o grasas) en las células de los organismos así como en la transferencia de lípidos de un microorganismo a otro. Por otra parte, ciertos microorganismos tienen capacidad para producir agentes emulsificantes o biosurfactantes que permiten la solubilización de lípidos y facilitan su metabolización (Hassan et al., 2006).

La presencia de lipasas fue observada en 1901 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens*, que representan las bacterias productoras de lipasas más estudiadas. El interés inicial en las lipasas se remonta a 1856, cuando Claude Bernard descubrió una lipasa en los jugos pancreáticos que

hidrolizaba grasas insolubles convirtiéndolas en productos solubles. Las lipasas han sido tradicionalmente obtenidas del páncreas de animales y se utilizan para consumo humano como coadyuvantes digestivos mezcladas o no con otras hidrolasas (pancreatina) (Hasan et al., 2006). El bajo stock de páncreas necesarios para la síntesis de dichas enzimas y la dificultad de obtención motivaron un creciente interés en las lipasas de origen microbiano.

Las lipasas se diferencian según su origen (bacteriano, fúngico, de mamíferos, etc.) y sus propiedades y pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un amplio rango de ésteres carboxílicos, liberando ácidos grasos y glicerol (Hasan et al., 2006) (Figura 2).

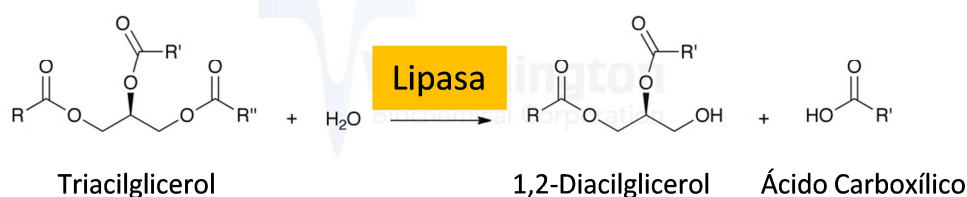


Figura 2. Principal reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa.

Algunos de los principales microorganismos productores de lipasas se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos productores de lipasa (Hasan et al., 2006).

BACTERIAS	Hongos
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Trichosporon laibacchii</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pichia burtonii</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<i>Chromobacterium viscosum</i>	
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	
<i>Acinetobacter sp.</i>	

Actualmente estas enzimas lipolíticas están despertando mucha atención debido a su potencial aplicación en el ámbito de la biotecnología, ya que constituyen el grupo más importante de biocatalizadores con aplicaciones en dicho campo (Benjamin y Pandey, 1998). Además, el número de aplicaciones va en aumento, destacando su potencial uso en la industria de

detergentes, aceites, industrias farmacéuticas, etc. (Sarkar et al., 1998; Cardenas et al., 2001). A su vez, muchas de las sustancias químicas derivadas de grasas y aceites podrían ser producidas por lipasas con mayor rapidez y especificidad que los actuales procesos de síntesis química. Además, las lipasas pueden ser utilizadas también para uso ambiental en aplicaciones tales como tratamiento de residuos, aguas residuales, bioremediación, degradación de contaminantes (Jaeger et al., 2002).

2.2.2. Aplicaciones

En la actualidad las lipasas tienen numerosos usos, tanto industriales como ambientales. Las lipasas microbianas constituyen un importante grupo de recursos biotecnológicos de gran valor debido a la versatilidad tanto de sus aplicaciones como de su producción en masa. Estas enzimas están diversificadas según sus propiedades enzimáticas y la especificidad del sustrato sobre el que actúan, lo que las hace muy atractivas para aplicaciones industriales (Hasan et al., 2006). En los próximos años se prevé que la industria aumente su uso en la fabricación de detergentes y cosméticos. A continuación se describen las aplicaciones de las lipasas tanto para fines industriales como ambientales.

Lipasas en la industria de aceites y grasas.

Las lipasas son parte de la familia de las hidrolasas que actúan en los enlaces éster carboxílicos, hidrolizando triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Figura 2). Además de esto, las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación. Esta versatilidad hace que las lipasas se reconozcan como los biocatalizadores de elección para potenciales aplicaciones en la industria de la alimentación, detergentes, industrias farmacéuticas, cuero, textil, cosmética y papeleras (Houde et al., 2004).

Algunas grasas tienen más valor que otras debido a su estructura. Las grasas con menor valor pueden ser convertidas en otras especies con mayor utilidad mediante métodos químicos, pero ello conlleva la utilización de más productos encareciendo el proceso (Hasan et al., 2006). Así, las lipasas catalizan la transesterificación haciendo que aceites de menor valor como por ejemplo el aceite de palma, pueda ser utilizado para la fabricación de manteca de cacao. Estas enzimas son utilizadas también para la fabricación de sustitutos de la grasa de leche humana como el "Betapol" para nutrición infantil, grasas de bajo valor calórico, etc. (Simons et al., 2006).

Producción de polímeros biodegradables

Las lipasas se han convertido en uno de los más importantes grupos de enzimas para la aplicación en síntesis de materiales orgánicos. Estas enzimas pueden ser utilizadas como biocatalizadores en la producción de materiales

biodegradables. Por ejemplo, el butil oleato ha sido producido por esterificación directa de butanol y ácido oleico para disminuir la viscosidad del biodiesel para su uso como combustible durante el invierno (Hasan et al., 2006). También se han sintetizado mediante lipasas ésteres de trimetilolpropano, que son útiles como lubricantes. Estas enzimas pueden catalizar la síntesis de ésteres y reacciones de transesterificación. Adicionalmente se ha abierto la posibilidad de producir poliésteres biodegradables mediante biocatálisis con lipasas (Linko et al., 1998).

Lipasas para tratamiento de aguas residuales y afluentes.

El tratamiento de efluentes es necesario tanto en la industria como en la depuración de aguas residuales. En dicho ámbito se ha demostrado que algunas lipasas son útiles para el tratamiento de aguas ricas en lípidos. Las aguas residuales que contienen principalmente triglicéridos son tratadas mediante un proceso por el cual los triglicéridos son hidrolizados mediante lipasas (Bailey et al., 1986). En la actualidad ya existen empresas especializadas en el sector como Oasis Environmental Ltd., WW07P, la cual ha producido una variedad de productos formulados con microorganismos productores de lipasas para el tratamiento biológico de aguas residuales ricas en grasas y aceites (Hasan et al., 2006).

Lipasas para biodegradación de aceites

La degradación natural de hidrocarburos de petróleo en ambientes fríos, incluyendo suelos alpinos, se debe a la actividad de microorganismos adaptados a dichos ambientes que pueden utilizar tales sustratos como nutrientes. Estos microorganismos se han investigado y se han descrito diversos genes involucrados en la degradación de hidrocarburos aromáticos (gen xylE de *Pseudomonas putida*), y aromáticos policíclicos (genes ndoB y nidA de *P. putida* y *Mycobacterium* sp. PYR-1, respectivamente) (Margesin et al., 2003).

Por otra parte, Vasileva-Tonkova y Galabova (2003) demostraron que monocultivos bacterianos aislados a partir de aguas residuales contaminadas con lubricantes procedentes de una central eléctrica fueron los principales responsables de la depuración del agua contaminada con hidrocarburos. Esta actividad se atribuyó a enzimas hidrolíticas.

Además, algunas especies de hongos tienen capacidad para degradar aceites vertidos en la costa, con lo que pueden tener aplicación en la restauración de ambientes contaminados por vertidos petroleros (Gopinath et al., 1999), del mismo modo que se tratan las aguas residuales industriales mediante procesos enzimáticos.

Lipasas para producción de biodiesel

Las fuentes limitadas (y en constante consumo) de combustibles fósiles, el precio al alza del petróleo y los impactos ambientales negativos derivados de

su procesado y uso son razones suficientes para explorar el uso de aceites vegetales como combustibles alternativos (Shah et al., 2004). El combustible generado a partir de tales materiales, el biodiesel, puede ser obtenido mediante la utilización de lipasas 1,3-regioespecíficas que en condiciones óptimas, transesterifican un mol de triglicérido (TG) con etanol para obtener dos moles de éster etílico y un mol de monoglicérido (MG), evitándose así la obtención de glicerina. En la actualidad, la glicerina se considera un residuo o un producto muy poco rentable, que además puede ocasionar graves problemas en los motores si no ha sido eliminada totalmente de la mezcla empleada. Estos nuevos biocombustibles presentan numerosas ventajas entre las que destaca el hecho de que su combustión no produce óxidos de azufre y minimiza la emisión de partículas en suspensión tres veces en comparación con los combustibles existentes procedentes del petróleo (Fan et al., 2012). Por tanto, el biodiesel puede ser un sustituto adecuado para el diesel convencional (Iso et al., 2001).

3. Material y Métodos

3.1. Colección de microorganismos y mantenimiento

Los microorganismos estudiados en este trabajo fueron 21 bacterias aisladas a partir de restos vegetales hortícolas sometidos a compostaje y seleccionadas por poseer actividad lipolítica. El aislamiento y selección de dichos microorganismos constituye una parte de un amplio trabajo llevado a cabo en el contexto de dos proyectos financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2009-08405 y AGL2012-36434) cuyo objetivo principal es el estudio de la microbiota asociada al proceso de compostaje. Aunque dicha fase previa no ha sido realizada durante la ejecución de este TFG, con el fin de comprender la terminología utilizada y la procedencia de la colección analizada se describe brevemente cómo se obtuvo la colección de aislados y la selección de los mismos de acuerdo a su actividad lipolítica.

Inicialmente se llevó a cabo un proceso de compostaje con tres pilas (1,0 m x 1,5 m x 1,2 m; ancho x largo x alto) constituidas por una mezcla de restos de plantas de tomate y astillas de pino trituradas y mezcladas a partes iguales. Las pilas se sometieron a aireación forzada y volteos durante la fase biooxidativa. Se realizaron muestreos durante las fases críticas del proceso tal y como se refleja en la Tabla 4.

Para el cultivo y cuantificación de las bacterias, las muestras de compost obtenidas fueron suspendidas en una proporción de 1/10 (p/V) en solución salina estéril (NaCl, 0,9%, p/V) realizándose a continuación diluciones decimales seriadas que fueron sembradas en placas con medio APHA (Cultimed, Barcelona) o medio para aislamiento de actinomicetos SCA (Difco, USA). Tras 24-48 horas de cultivo a 30°C (mesófilos) o 50 °C (termófilos) se seleccionaron las placas en las que podía realizarse un recuento colonial fiable. En dichas placas fueron seleccionados y contados los diferentes morfotipos coloniales.

Tabla 4. Muestreos realizados durante el compostaje.

Condiciones	Muestra	Día del proceso
Materias Primas	MPR	0
Mesófila en Ascenso	MESA1	1
Termófila	TER1A	2
Termófila	TER1B	5
Mesófila en Descenso	MESD1	7
Mesófila en Ascenso	MESA2	8
Termófila	TER2A	9
Termófila	TER2B	12
Mesófila en Descenso	MESD2	14
Mesófila en Ascenso	MESA3	15
Termófila	TER3A	16
Mesófila en Descenso	MESD3	26
Mesófila en Ascenso	MESA4	28
Enfriamiento	MES5	42
Enfriamiento	MES6	56
Enfriamiento	MES7	63
Maduración	MAD1	119
Maduración	MAD2	168
Producto Final	PRF	189

Cada uno de los morfotipos detectados en el proceso anterior fueron aislados en placas con APHA (Cultimed, Panreac) e incubados a 30 °C (mesófilos) o 50 °C (termófilos) durante 24-48 horas hasta obtener cultivos puros de cada morfotipo distinto. Los aislados constituyeron el punto de partida de la colección de bacterias. Cada morfotipo singular descrito por primera vez en una muestra se denominó "cepa tipo" y se realizaron comparaciones morfológicas de otras con respecto a ella. Cada cepa se nombró con un código que informa del grupo microbiano (BM-BTo AM para aislados en APHA o SCA, respectivamente), muestreo (MPR a PRF según Tabla 4), repetición de pila (1,2,3...). Dicha información se expresó de la siguiente forma: grupo microbiano-muestreo-repetición pila y muestra-nº de morfotipo en placa. A la colección final se le asignaron números.

Cada una de las bacterias aisladas fueron analizadas para determinar cualitativamente si expresaban actividad lipolítica. Para ello se utilizó la metodología descrita por Carrasco et al. (2012). Las bacterias fueron sembradas en un medio sólido opaco que contenía tributirina (Tabla 5), tras incubación a 30°C durante 24-48h las bacterias con actividad lipolítica aclaraban el medio debido a la hidrólisis de la tributirina (Figura 3).

Tabla 5. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad lipolítica.

Componente	g/L
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Tributirina (Fluka No. 91010)	10
Agar bacteriológico	20

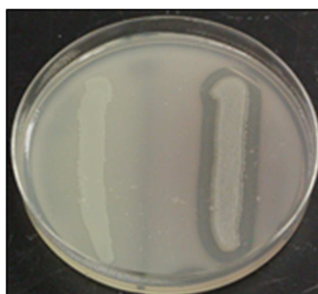


Figura 3. Bacteria lipolítica (derecha) y no lipolítica (izquierda) en análisis cualitativo.

La colección de bacterias lipolíticas obtenidas de acuerdo con la metodología precedente que se estudió en este TFG estuvo constituida por 21 cepas, cuyo origen y código de identificación (Id General) se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Colección de bacterias lipolíticas.

Id General	CepaTipo	Origen
50	AM-MESA1-1B-04	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase mesófila ascendente
198	AM-MESA2-3B-05	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase mesófila ascendente
557	AM-MESD3-3A-05	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase mesófila ascendente
701	AM-MES6-1A-17	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de enfriamiento
718	AM-MES6-1B-11	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de enfriamiento
770	AM-MES6-3A-03	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de enfriamiento
822	AM-MES7-1B-12	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de enfriamiento
960	AM-MAD1-2B-06	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de maduración
975	AM-MAD1-3A-08	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de maduración
1005	AM-MAD2-1B-07	Aislado en medio SCA a 30 °C, fase de maduración
1037	AM-PRF-1A-07	Aislado en medio SCA a 30 °C, producto final
1053	AM-PRF-2A-06	Aislado en medio SCA a 30 °C, producto final
1374	AT-MESA2-2A-08	Aislado en medio SCA a 50 °C, fase mesófila ascendente
1406	AT-TER2A-1A-02	Aislado en medio SCA a 50 °C, fase termófila
1450	AT-TER2A-3A-09	Aislado en medio SCA a 50 °C, fase termófila
2286	BM-TER2A-3A-09	Aislado en medio APHA a 30 °C, fase termófila
2330	BM-TER2B-3A-04	Aislado en medio APHA a 30 °C, fase termófila
2410	BM-MESA3-2A-02	Aislado en medio APHA a 30 °C, fase mesófila ascendente
3084	BT-TER1A-2B-13	Aislado en medio APHA a 50 °C, fase termófila
3155	BT-TER1B-2B-07	Aislado en medio APHA a 50 °C, fase termófila
3679	BT-MESA4-1A-16	Aislado en medio APHA a 50 °C, fase mesófila ascendente

Aunque algunas de las cepas en estudio fueron aisladas originalmente en condiciones de termofilia (Tabla 6), análisis paralelos permitieron comprobar que su óptimo de crecimiento se encontraba en torno a 30 °C, por ello todas las bacterias de la colección fueron consideradas como mesófilas en este trabajo.

El mantenimiento de la colección se realizó de dos formas:

- Conservación a corto plazo y manejo rutinario las cepas fueron resembradas mensualmente en APHA en placa o en tubo de agar inclinado.
- Conservación a largo plazo las cepas fueron criogenizadas a -80°C en glicerolal 20% o en el sistema Cryoinstant (Deltalab, Barcelona).

3.2. Identificación

La colección de cepas lipolíticas fue identificada mediante secuenciación del gen 16S ADNr. La parte experimental correspondiente a la extracción del ADN a partir de cada cepa, amplificación mediante PCR utilizando cebadores específicos (27F/1492R), purificación y obtención de las secuencias no fue ejecutada en este TFG, pero sí el análisis informático de las secuencias obtenidas. La descripción de la metodología utilizada para la obtención de las secuencias se detalla en Sánchez-Fortún (2013).

Para el análisis de las secuencias primero se construyó el fragmento 16S ADNr a partir de las secuencias sentido (Forward) y antisentido (Reverse). El fragmento obtenido fue comparado con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI. Para ello se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Sequence scanner v1.0 (Applied Biosystem 2005¹) para visualizar y copiar las secuencias Forward (F) y Reverse (R) y transferir las primeras a fichero FASTA en block de notas de Windows.
- Reverse complement², programa online que permite obtener el reverso complementario (RCR) del fragmento antisentido (R) cuya secuencia se incluye también en el archivo FASTA.
- ClustalX v2.0.11³ para alinear las secuencias F y RCR incluidas en el archivo FASTA.
- Mega 5⁴ para editar las secuencias alineadas, copiarlas y construir el fragmento completo que se archiva en fichero FASTA.
- Base de datos del National Center for Biotechnology Information⁵ (NCBI) para la comparación de los fragmentos obtenidos a través de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

¹ www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html

² www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

³ www.clustal.org/

⁴ www.megasoftware.net/

⁵ www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.ncbi.nlm.nih.gov/

3.3. Producción y cuantificación de lipasas

Para determinar la cantidad de enzima que producían las cepas lipolíticas en estudio se realizaron cultivos de las mismas en medios líquidos en los que se estimuló la producción de lipasa. A partir de estos medios se obtuvieron extractos enzimáticos que fueron utilizados durante la fase de reacción enzimática, en la que se cuantificó la actividad lipasa.

3.3.1. Producción de lipasas

Las bacterias fueron cultivadas en el medio de producción cuya composición se detalla en la Tabla 7 y que contenía el triglicérido tributirina como una de las fuentes de carbono principales. La preparación del inóculo, condiciones de cultivo y obtención de los extractos enzimáticos se describen a continuación.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo líquido para la producción de lipasa.

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Tributirina (ACROS No. 150882500)	10
Medio mínimo de sales de Janshekar, volumen de cada sal*	100 mL

Preparación: Los componentes se disuelven en 700mL de agua destilada y la solución se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Tras la esterilización las sales se incorporan en condiciones asépticas.

***Medio mínimo de sales** (Janshekar et. al., 1982)

Solución A:		Solución B:		Solución C:	
K ₂ HPO ₄	16,0 g	NaCl	2,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	12,5 g
KH ₂ PO ₄	5,0 g	MgSO ₄ 7·H ₂ O	5,8 g	(NH ₄)NO ₃	10,0 g
Agua Destilada c.s.p.	1000,0 ml	CaCl ₂ 2·H ₂ O	0,13 g	FeCl ₃ 6·H ₂ O	0,025 g
		Agua Destilada c.s.p.	1000,0 ml	Agua Destilada c.s.p.	1000,0 ml

Preparación medio mínimo de sales: Cada solución se prepara y esteriliza por separado (121°C/20 min).

Para la preparación de un inóculo estandarizado, las bacterias fueron sembradas en placas con medio APHA (Cultimed) e incubadas durante 24 h a 30 °C. A partir de estos cultivos (preinóculos) se realizó una suspensión en tubos con solución salina estéril (NaCl, 0,9%, p/V) hasta alcanzar una turbidez comparable al 1 de la escala de MacFarland. En todos los casos se verificó la carga bacteriana alcanzada en los tubos con dicha turbidez mediante el método de Miles y Misra (Miles et al., 1938). Para ello se realizó una dilución decimal seriada a partir de la suspensión en solución salina estéril (NaCl, 0,9%, p/V), siembra en placa de 10 µL de las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁶, incubación 24 h a 30 °C y recuento de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) (Figura 4). El recuento medio de dichas suspensiones fue de 8x10⁸ UFC/mL.

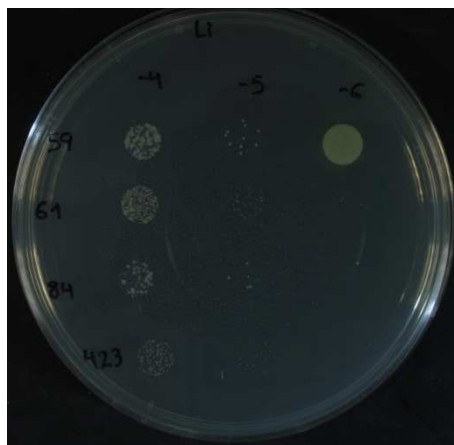


Figura 4. Recuento de colonias en el inóculo.

Las suspensiones celulares indicadas se utilizaron para inocular frascos ISO de 100 mL con 20 mL del medio de producción (Tabla 7). Se inocularon tres réplicas para cada cepa con 1 mL de la suspensión indicada.

Los cultivos se incubaron durante 72 h en agitación (100rpm) a 30°C, tras lo cual se realizó un aislamiento en APHA (Cultimed) para verificar la pureza del cultivo. Tras el período de incubación, 25 mL de los cultivos fueron centrifugados a 10.000 rpm y 4°C durante 10 minutos obteniendo un sedimento compacto constituido por la biomasa bacteriana y un sobrenadante transparente que constituye el extracto enzimático. Este sobrenadante se transfirió a tubo limpio y se conservó a -20°C hasta su procesamiento (Apdo. 3.3.2). El sedimento se utilizó para determinar el peso seco de biomasa bacteriana. Para ello, se resuspendió en el mínimo volumen de líquido, se incorporó en crisoles pesados (Pi) y se desecó en horno a 105 °C durante 24h. Los crisoles desecados fueron pesados (Pf) y se calculó la biomasa en mg/mL, considerando el volumen de cultivo centrifugado (15 mL), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$P_{\text{biomasa}} (\text{mg/mL}) = [(P_i - P_f) / V_{\text{centrifugado}}] \times 1000$$

3.3.2. Cuantificación de la actividad lipasa

La actividad lipasa fue cuantificada en los extractos enzimáticos de acuerdo con el método Farnet et al. (2010) modificado. El método de análisis consiste en la incubación de la muestra problema (extracto enzimático) con un éster del laurato (dodecanoato) unido a p-nitrofenol (p-nitrofenil-laurato o pNPL) (sustrato) en medio bifásico con heptano como solvente y agua. Tras incubación se estima el p-nitrofenol liberado y extraído en la fase acuosa mediante la adición de NaOH (Figura 5). Las disoluciones alcalinas del p-nitrofenol tienen un color amarillo (son incoloras a pH <5) y se pueden cuantificar en espectrofotómetro.

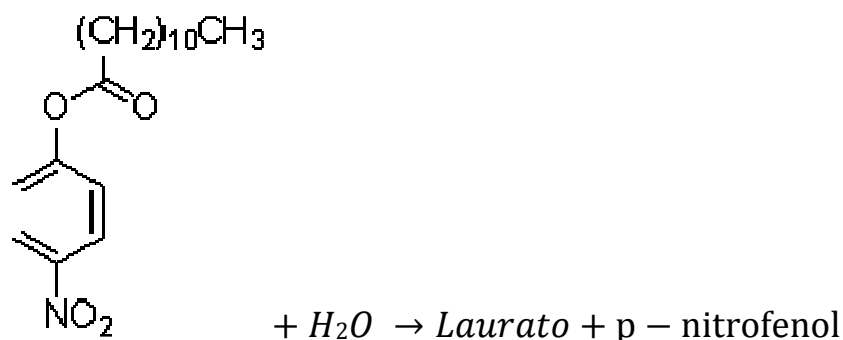


Figura 5. Reacción catalizada por la lipasa en la cuantificación de la actividad enzimática.

Los reactivos utilizados para la reacción enzimática y su preparación se describen a continuación:

- Solución 10mM de p-nitrofenil-laurato (pNPL): Se disuelven 32,1 g de pNPL (Sigma) en 5 mL de heptano.
- Solución comercial lipasa para el control positivo (Lipasa de *Candida rugosa*, Sigma): Se disuelven 10 mg de enzima por cada 10mL de agua destilada fría.
- NaOH 0,1M: Se disuelven 4g de NaOH en 1L de agua destilada.
- Reactivo p-nitrofenol standard 10mM (Sigma): Se utilizó para la preparación de la recta patrón. Se prepararon soluciones en agua destilada con concentraciones de p-nitrofenol de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 µg/mL.

En cada reacción se incluyeron los siguientes controles:

- Control problema: Por cada muestra problema se preparó un control en el que el extracto enzimático se incorporó al final de la reacción. Este control permite eliminar interferencias causadas por productos presentes en el extracto al inicio o liberados durante la reacción enzimática sin la intervención de la enzima.
- Control de reacción: Se incorpora un tubo control conteniendo la lipasa comercial previamente indicada en lugar del extracto, lo que permite verificar la bondad y fiabilidad del ensayo.

Para llevar a cabo la reacción, se incorporaron 500 µL de agua destilada y 500 µL de solución pNPL (sustrato) en eppendorf de 2 mL. Las muestras problema (extractos enzimáticos) y los reactivos en eppendorf se atemperaron durante 10 minutos hasta alcanzar la temperatura de reacción, tras lo cual se añadieron 500 µL de extracto enzimático a los tubos problema y 500 µL de enzima comercial diluida 1/10 al tubo control positivo. Las mezclas se agitaron en vortex para homogeneizarlas y se incubaron a 37°C durante 2 horas exactas a 80rpm. La reacción se detuvo depositando los tubos en hielo y a continuación

se añadieron 500 μL de extracto enzimático a los tubos control problema y se agitaron en vortex. Para recuperar el p-nitrofenol liberado se extrajo 1mL de la fase acuosa y se transfirió a eppendorf de 1,5 mL. Tras centrifugar a 10.000rpm durante 10 minutos a 4°C se transfirieron 125 μL de la fase acuosa a tubos que se conservaron a -20°C hasta que se realizó la cuantificación del producto de reacción (p-nitrofenol).

La cuantificación del p-nitrofenol en las muestras obtenidas se realizó mediante la adición de 1mL de NaOH 0,1 M a los 125 μL de muestra (producto de reacción). Las disoluciones alcalinas de p-nitrofenol adquieren un color amarillo a pH superior a 5, que se cuantificó espectrofotométricamente a 400nm utilizando microplacas de 96 pocillos. Las microplacas se cargaron con 200 μL de las mezclas problema con NaOH, realizando tres réplicas por muestra. La lectura de la absorbancia a 400 nm se realizó en un espectrofotómetro de microplacas EON (Biotek, USA). En cada tanda analítica se incluyó una placa con la curva patrón de p-nitrofenol, y cada placa con muestras problema y sus controles contenía blancos con agua y NaOH y un control positivo (Figura 6).

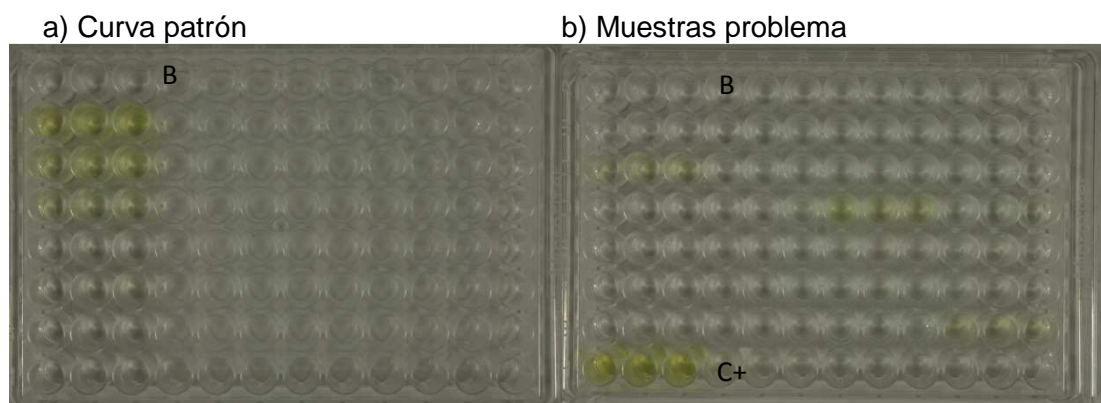


Figura 6. Microplacas para la cuantificación de los productos de reacción (p-nitrofenol): a) Placa con la curva patrón (p-nitrofenol 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 $\mu\text{g/mL}$); b) Placa con las muestras problema y posición de blancos (B) y control positivo (C+).

Los datos obtenidos se procesaron con el programa Gen5 (Biotek, USA) que se configuró para suministrar los datos de concentración de p-nitrofenol tras restar el blanco a las medidas de absorbancia. Para cada muestra se obtuvieron dos valores promedio ($n=3$):

- Cp: Concentración de p-nitrofenol en la muestra problema.
- Cc: Concentración de p-nitrofenol en la muestra control problema.

Para el cálculo de la actividad enzimática se consideró la definición de la unidad de actividad lipasa como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µg de p-nitrofenol en 1 min de reacción en las condiciones del ensayo. De acuerdo con esto, la actividad lipasa (U/mL) se calculó para cada muestra según la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Cp - Cc) \times Vr}{Ve \times T}$$

Donde

AE: Actividad lipasa (U/mL=µg p-nitrofenol liberado/min mL).

Cp: Concentración de p-nitrofenol de la muestra.

Cc:Concentración de p-nitrofenol en la muestra control problema.

Vr: Volumen de reacción (1,5 mL).

Ve: Volumen de extracto enzimático (0,5 mL).

T: Tiempo de incubación (120 min).

Adicionalmente, la actividad enzimática también se expresó en unidades de actividad lipasa por mg de biomasa de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$AEb \text{ (U/mg biomasa)} = AE/P_{\text{biomasa}}$$

3.4.Análisis de datos

Todos los resultados fueron inicialmente procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, en el que se realizaron las gráficas correspondientes.

Para cada cepa se obtuvieron tres extractos enzimáticos en los que se analizó la actividad lipasa por mL de extracto (AE, U/mL) y por mg de biomasa (AEb, U/mg). Se analizó el efecto del factor cepa en la variabilidad de ambos parámetros mediante un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA), mientras que para la evaluación de la existencia de diferencias significativas para cada nivel del factor indicado se utilizó el Test de Mínima Diferencia de Fisher (MDS), utilizando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Adicionalmente se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson para establecer la relación entre las dos variables independientes analizadas (AE y AEb). Para estos análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI version 16.1.17 (StatPoint, Inc., Virginia).

4. Resultados y Discusión

4.1. Identificación de microorganismos lipolíticos

Los resultados de la identificación de las 21 cepas lipolíticas se listan en la Tabla 8, con indicación de la especie, su clasificación taxonómica, el número de pares de bases secuenciadas, porcentaje de homología de la secuencia con la correspondiente en el Genbank del NCBI y el número de acceso de la misma. En las Figuras 7a y 7b se muestran las morfologías coloniales de los aislados.

Las cepas cuya secuencia tiene una homología (% Identidad) con la depositada en el Genbank NCBI inferior al 97% pueden ser catalogadas sólo a nivel de género (Tindall et al., 2010). En este caso, todas las secuencias superaron dicho límite, excepto las correspondientes a las cepas 557 y 3084, por lo que el resultado de su identificación a nivel de especie no se puede considerar fiable, aunque se pueden catalogar como pertenecientes al género indicado. Para la correcta clasificación de estas cepas se debería realizar un estudio más profundo, bien obteniendo secuencias de mayor longitud o bien secuenciando otras partes del genoma y realizando análisis fenotípicos complementarios que permitan determinar la especie a que pertenecen. Cabe destacar que, en ambos casos, las secuencias obtenidas fueron inferiores a 600pb, considerando que la longitud del gen 16S es de alrededor de 1550pb, la causa probable de la escasa similitud sea la primera. Esta analítica excede el objetivo prioritario de este trabajo, aunque se utilizará la denominación de las especies más similares para ambas cepas.

Las cepas bacterianas identificadas estuvieron incluidas por especies pertenecientes a dos Phyla (Firmicutes y Proteobacteria) de los 30 actualmente reconocidos en la LPSN ("List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature") (Euzéby, 1997). En ambos grupo se encuadran las cepas productoras de lipasas de mayor relevancia, entre las que destacan los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas* del Phylum Proteobacteria; así como una amplia variedad de especies del género *Bacillus*, Phylum Firmicutes (Gupta et al., 2004).

Entre las cepas analizadas, las especies de este último género fueron las más abundantes con 8 especies, a las que se suman dos géneros estrechamente relacionados, *Geobacillus* y *Lysinibacillus*. Existe una amplia referencia documental respecto a la producción de lipasas por cepas de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus*, de modo que se han aislado 70 lipasas diferentes producidas por dichos géneros (Guncheva y Zhiryakova, 2011). Prácticamente en todas las especies del género *Bacillus* estudiadas se ha detectado la enzima en trabajos previos (Gupta et al., 2004; Treichel et al., 2010), de igual forma, ha sido descrita en *Geobacillus stearothermophilus* (Dror et al., 2014) y *Lysinibacillus sphaericus* (Odeyemi et al., 2014).

Respecto a los otros dos representantes del Phylum Firmicutes, *Staphylococcus* y *Chryseomicrobium*, sólo el primero ha sido previamente descrito como productor de lipasa. La producción de lipasa por diversas especies del género *Staphylococcus* es bien conocida debido a que está implicada en el poder patógeno de dichos microorganismos (Horchani et al., 2012). Concretamente se ha detectado dicha actividad en *Stph.aureus*, *Stph. hyicus*, *Stph.epidermidis*, *Stph. warneri*, *Stph. simulans* y *Stph. xylosus* (Rosenstein y Götz, 2000), sin embargo, no se había descrito hasta la actualidad para *Stph. equorum*. De igual forma, este es el primer trabajo en el que se describe una cepa de *Chryseomicrobium imtechense* lipolítica. Esta especie ha sido recientemente identificada, y la cepa tipo carece de dicha actividad (Arora et al. 2011).

Entre las cepas pertenecientes al Phylum Protobacteria, la actividad lipasa ha sido detectada previamente en *Chelatococcus daeguensis* (Yoon et al., 2008), *Brevundimonas diminuta* (Segers et al., 1994) y *Parapusillimonas granuli* (Kim et al., 2010); sin embargo, no existe información previa de esta actividad en cepas de *Citrobacter sedlakii* y la cepa tipo de la especie carece de la misma (Brenner et al., 1993).

En relación con la presencia de las cepas identificadas en el proceso de compostaje, todas las especies identificadas han sido descritas previamente en procesos de compostaje (de Gannes et al., 2013; Jurado et al., 2014).

Las especies de *Bacillus* tienen la capacidad para sobrevivir a las variaciones térmicas que ocurren durante el proceso debido a su capacidad para formar endosporas. Por ello, constituye uno de los géneros bacterianos dominantes durante todas las fases del compostaje (Dees y Ghiorse, 2001; Chandna et al., 2013; Jurado et al., 2014), y es el taxón bacteriano que más se ha detectado en las materias primas utilizadas para compostaje (Ryckeboer et al., 2003).

Las proteobacterias son usualmente reconocidas como constituyentes menores de la comunidad microbiana implicada en el compostaje (Partanen et al., 2010; Chandna et al., 2013), principalmente debido a su mayor sensibilidad a cambios térmicos. Sin embargo, de Gannes et al. (2013) demostraron que este grupo tiene una notable prevalencia en la fase mesofílica, mientras que Jurado et al. (2014) pusieron de manifiesto que determinadas especies de este Phylum son capaces de resistir las fases termófilas y persistir en la pila de compostaje durante gran parte de su desarrollo.

Tabla 8. Resultados de la identificación molecular (16S ADN_r) de las bacterias lipolíticas estudiadas y clasificación taxonómica*.

Id General	Identidad	pb	% Identidad	No. Acceso
Phylum Firmicutes				
Clase Bacilli				
<i>Orden Bacillales</i>				
<i>Familia Bacillaceae</i>				
1450	<i>Bacillus aerius</i>	748	98	KF861585.1
1037	<i>Bacillus aerophilus</i>	1351	99	JX049585.1
975	<i>Bacillus altitudinis</i>	1354	99	KF535147.1
960	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1296	99	KC855269.1
1374	<i>Bacillus licheniformis</i>	977	99	KC609000.1
718	<i>Bacillus megaterium</i>	976	99	KF641928.1
2286	<i>Bacillus mojavensis</i>	1307	99	JX843765.1
3155	<i>Bacillus niabensis</i>	1301	99	NR_043334.1
770	<i>Bacillus pumilus</i>	1349	99	FJ763644.1
2330	<i>Bacillus safensis</i>	1286	99	JQ353775.1
3084	<i>Bacillus sonorensis</i>	582	96	JX981917.1
2410	<i>Bacillus stratosphericus</i>	874	99	KC995118.1
1406	<i>Bacillus subtilis</i>	1369	99	JN366756.1
1053	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1407	99	JQ912678.1
1005	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	917	99	GU125639.1
<i>Familia Planococcaceae</i>				
822	<i>Chryseomicrobium imtechense</i>	915	99	GQ927308.1
<i>Familia Staphylococcaceae</i>				
557	<i>Staphylococcus equorum</i>	957	96	JX315307.1
Phylum Proteobacteria				
Clase Alphaproteobacteria				
<i>Orden Rhizobiales</i>				
<i>Familia Beijerinckiaceae</i>				
3679	<i>Chelatococcus daeguensis</i>	1317	99	HM000004.1
<i>Orden Caulobacterales</i>				
<i>Familia Caulobacteraceae</i>				
198	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1242	99	HM217129.1
Clase Betaproteobacteria				
<i>Orden Burkholderiales</i>				
<i>Familia Alcaligenaceae</i>				
701	<i>Parausillimonas granuli</i>	858	98	GQ422442.1
Clase Gammaproteobacteria				
<i>Orden Enterobacteriales</i>				
<i>Familia Enterobacteriaceae</i>				
50	<i>Citrobacter sedlakii</i>	1324	99	GU726186.1

* La clasificación taxonómica de las bacterias identificadas se realizó de acuerdo con la base de datos "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (LPSN) (Euzéby, 1997)(<http://www.bacterio.net>). Id General: Código de identificación de cada cepa (ver Tabla 6). pb: pares de bases secuenciados. N° Acceso: Número de acceso en el GenBank NCBI de la secuencia con la que se obtuvo la homología de cada cepa.

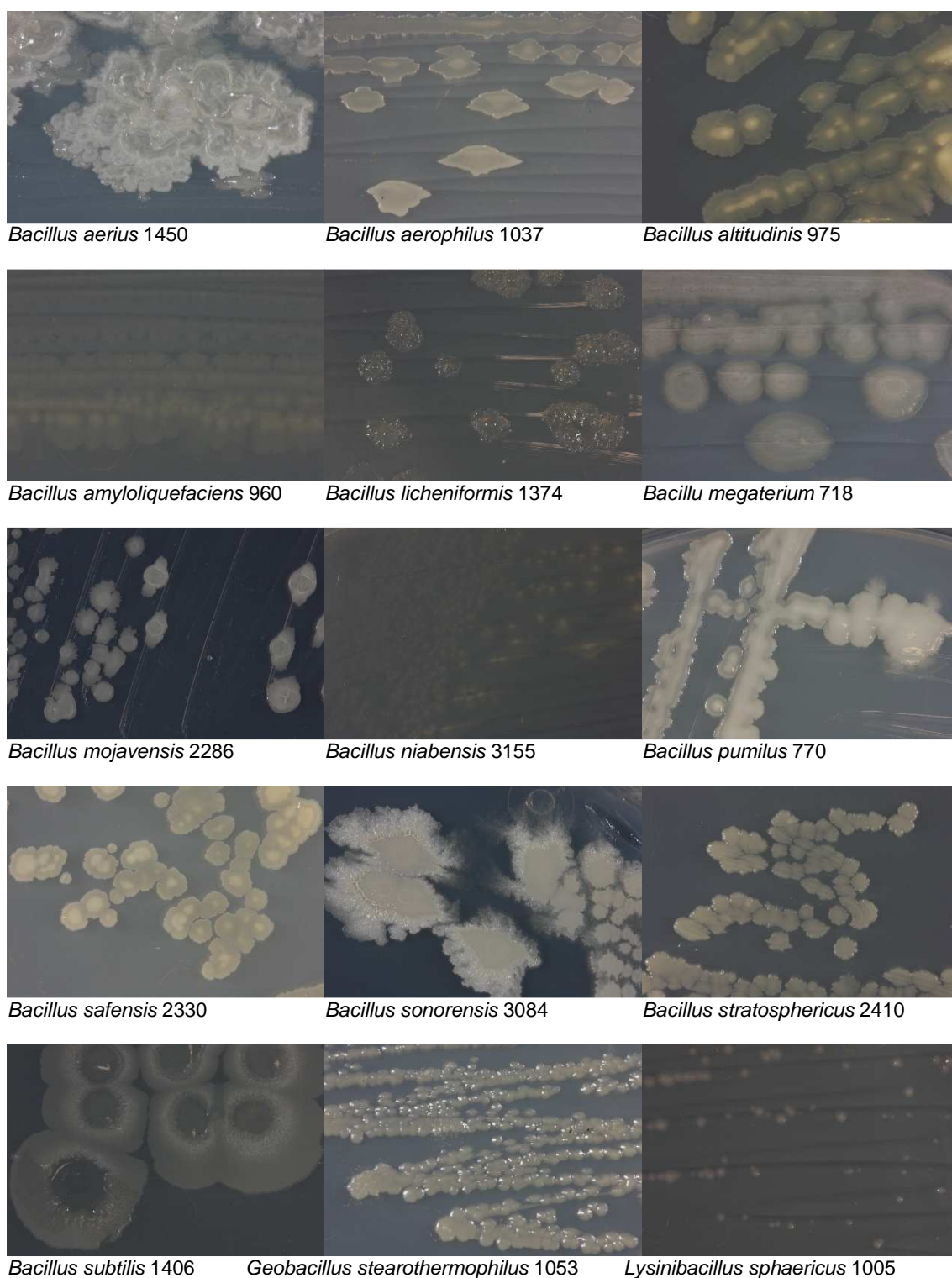


Figura 7a. Morfología colonial de las bacterias lipolíticas estudiadas. Se indica la especie según los resultados de identificación (Tabla 8) y el código de cepa. Cada placa se fotografió con una cámara Canon modelo EOS 450D, dotada con objetivo Zoom EF-S18-55 mm f/3.5-5.6 IS.

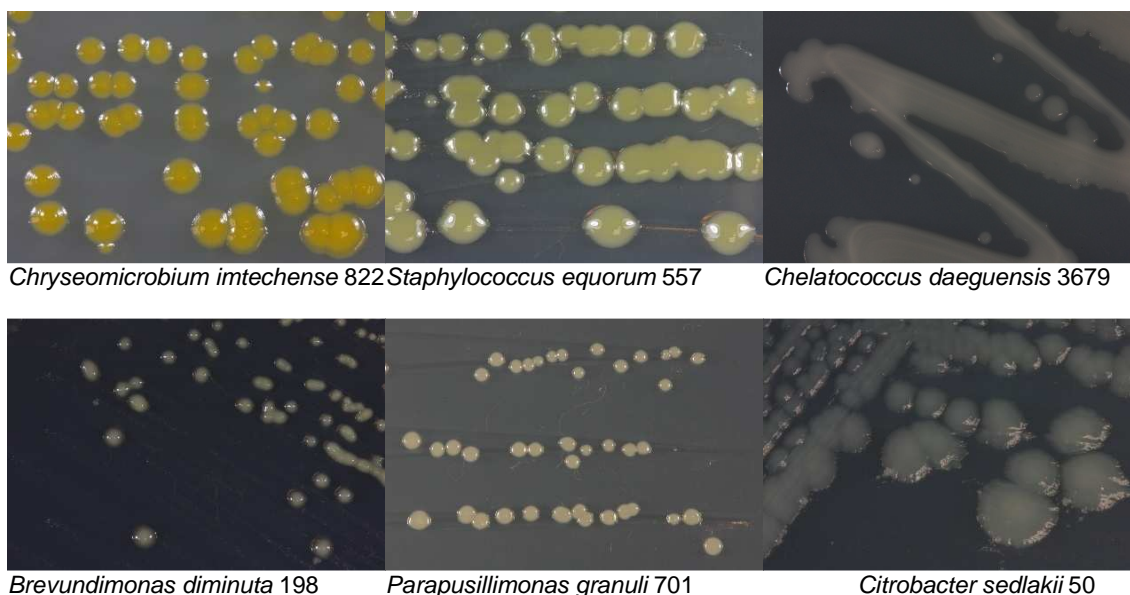


Figura 7b. Morfología colonial de las bacterias lipolíticas estudiadas. Se indica la especie según los resultados de identificación (Tabla 8) y el código de cepa. Cada placa se fotografió con una cámara Canon modelo EOS 450D, dotada con objetivo Zoom EF-S18-55 mm f/3.5-5.6 IS.

4.2. Producción de lipasa

Las lipasas son hidrolasas que actúan en las uniones carboxilester de triacilglicerol liberando ácidos grasos y glicerol. Los sustratos de estas enzimas son triacilglicéridos de cadena larga que tienen escasa solubilidad en agua, y la actividad hidrolítica es realizada por ellas en la interfase lípido-agua (Gupta et al., 2004). Tal y como se describió en el apartado de Revisión Bibliográfica, estas enzimas constituyen un grupo de interés biotecnológico y tienen numerosas aplicaciones en el procesado de alimentos, productos lácteos, fabricación de detergentes y productos farmacéuticos (Hasan et al., 2006).

En la Figura 8 se muestra la producción de lipasa por las cepas analizadas expresada en U por mL de cultivo (Figura 8a) y por mg de biomasa (Figura 8b). Aunque la forma más frecuente de expresar la producción de la enzima es la primera, en este trabajo se consideró adecuado relativizar las unidades de actividad enzimática a la carga microbiana (biomasa) al final del cultivo, para que los rendimientos de producción de cada cepa fueran comparados de forma más adecuada. Sin embargo, como se desprende del perfil obtenido en las dos figuras, los resultados fueron muy similares en ambos casos. De hecho existió una fuerte correlación lineal entre ambas variables ($r=0,95$, $p<0,001$), según reveló el análisis de correlación de Pearson.

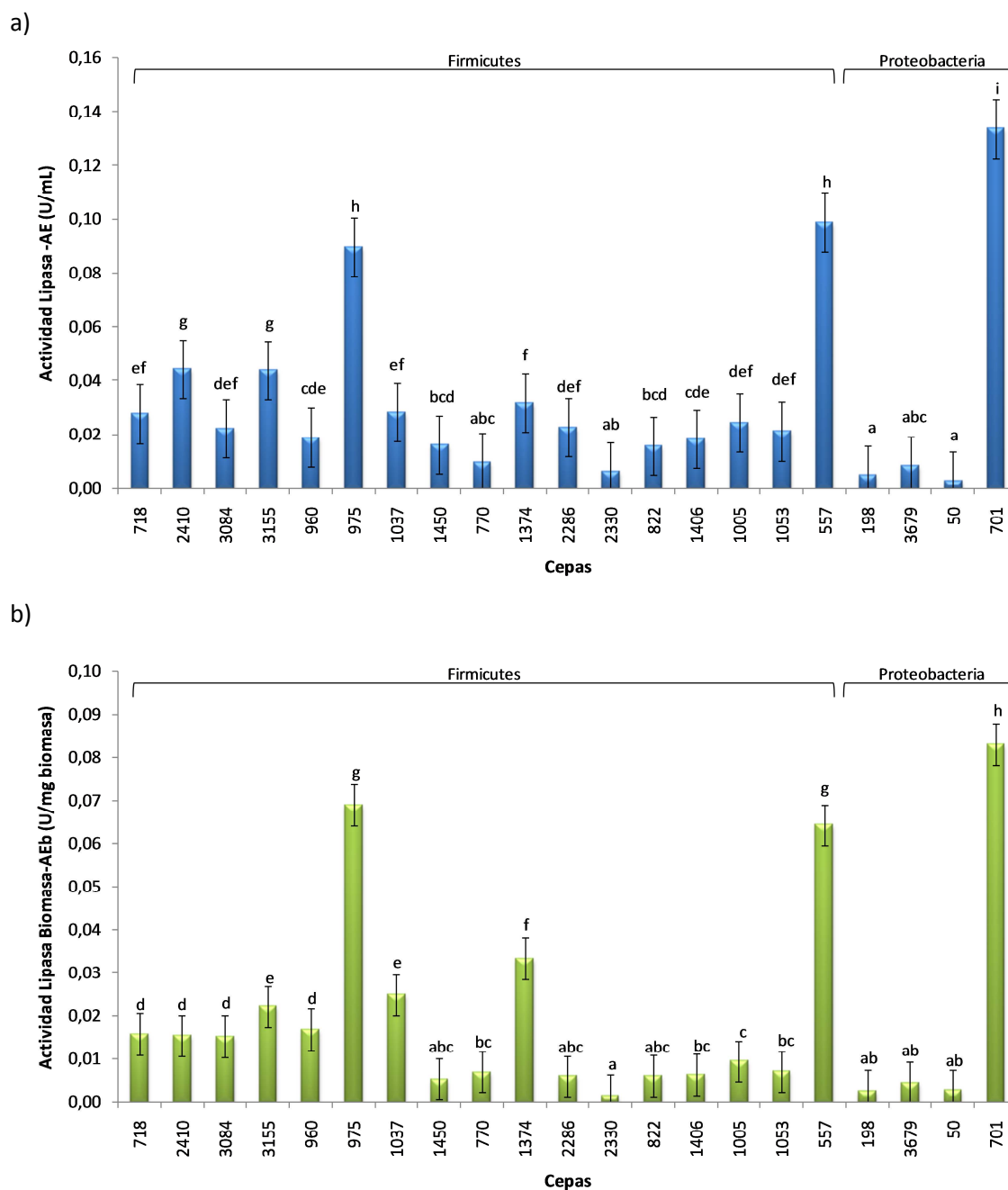


Figura 8. Producción de lipasa por las cepas analizadas: a) Actividad por mL de cultivo; b) Actividad por mg de biomasa. En el eje X se representa el código de cepa cuya identificación se muestra en la Tabla 8 y se especifican las cepas incluidas en los dos phyla. Los resultados son la media de tres repeticiones y las barras de error representan la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher ($P < 0,05$). Los valores con la misma letra no muestran diferencias estadísticamente significativas.

En general, los valores de producción fueron bastante bajos en la mayoría de las cepas, no superando las 0,04 U/mL (o 0,03 U/mg de biomasa), destacando tres cepas por sus niveles de producción, *Bacillus altitudinis* 975 y *Staphylococcus equorum* 557, ambas con una producción de alrededor de 0,1 U/mL y *Parapusillimonas granuli* 701 con 0,13 U/mL. Aunque resulta muy difícil comparar los niveles de actividad lipasa en U/mL con los obtenidos por otros autores debido a la amplia diversidad de condiciones de reacción que se utilizan para su cuantificación, incluyendo diferentes sustratos, pH, mezclas de reacción, etc., los niveles producidos para estas tres últimas cepas se pueden considerar en el rango de los informados por algunos autores (Hun et al., 2010; Mahdi et al., 2012). Para establecer una comparativa más adecuada la actividad enzimática se expresa en U por mg de proteína en extractos purificados de la enzima, también conocida como actividad enzimática específica. Este parámetro permite obtener una información más fidedigna de la actividad real de la enzima, ya que se refiere exclusivamente al peso de la enzima. Dicha analítica implica realizar procesos de purificación de los extractos enzimáticos por peso molecular que exceden el objetivo fundamental de este trabajo que pretende seleccionar las cepas potencialmente idóneas para la producción de la enzima. Además, cabe considerar que, aunque no se dispone de datos específicos para las lipasas comerciales, la mayoría de preparados comerciales son extractos crudos como los utilizados en este trabajo y suelen informar la actividad en U/mL. Por tanto, la selección de cepas mediante este parámetro se puede considerar adecuada en esta fase preliminar. La determinación de la actividad enzimática específica constituye uno de los objetivos de futuro de este trabajo y será realizada para las enzimas de las cepas que mejores resultados hayan mostrado.

Dos de las tres especies con mayores niveles de producción pertenecen a géneros típicamente asociados a la producción de lipasa, *Bacillus* y *Staphylococcus*, y para los que existe amplia información relativa a condiciones de producción y propiedades. Por el contrario, no se han publicado estudios en los que se cuantifique la producción de lipasa en *Parapusillimonas granuli*. De hecho, el encuadre taxonómico de dicha especie es relativamente reciente (Kim et al., 2010), con lo cual constituye un microorganismo cuyas potencialidades aún no han sido plenamente explotadas. Este trabajo, por tanto, constituye la primera referencia en la que se cataloga a dicha especie como potencial productora de lipasa.

Tal y como se ha comentado, el género *Staphylococcus* incluye especies productoras de lipasa (Rosenstein y Götz, 2000; Horchani et al., 2012), aunque no existe información sobre dicha actividad en *Stph. equorum* y, por tanto, tampoco de sus niveles y condiciones de producción o características. Cabe mencionar que las lipasas de dicho género están despertando un gran interés debido a su potencial aplicación para la síntesis de moléculas de alto valor añadido. Recientemente se han aislado, purificado y caracterizado diversas lipasas estafilocócicas útiles como agentes biocatalizadores de reacciones de transesterificación, alcoholisis y esterificación de alcoholes con ácidos orgánicos, además de otras típicas de las lipasas (Horchani et al., 2012).

En el caso de *Bacillus altitudinis* 975, la actividad se encuentra en el rango de la informada por Hun et al. (2010) para *Bacillus sphaericus* que produjo en torno a 0,1 U/mL. En dicho trabajo la optimización de los componentes del medio de cultivo consiguió cuadruplicar dicha producción. A pesar de la diversidad de propiedades que exhiben las lipasas de *Bacillus* constituyen un grupo distinguible entre otras lipasas. En general, tal y como indican Guncheva y Zhiryakova (2011), estas lipasas se producen fácilmente y presentan una elevada tolerancia a solventes orgánicos, por lo que resultan valiosas para la síntesis de ésteres en las industrias de alimentos, cosméticos y en la producción de biodiesel. Además, algunas de las lipasas de este grupo son estables frente a temperaturas y pHs extremos, y en presencia de surfactantes, peróxido de hidrógeno o hipoclorito sódico, por lo cual pueden aplicarse en formulaciones de detergentes.

Finalmente debe considerarse que las lipasas son enzimas inducibles (Lotti et al., 1998) y como tales son producidas generalmente en presencia de una fuente lipídica tal como aceite, triacilglicerol, ácidos grasos, ésteres hidrolizables, Tween, sales biliares y glicerol (Gupta et al., 2004). La producción de la enzima está fuertemente influida por la composición del medio de cultivo, principalmente las fuentes de carbono y nitrógeno, su pH y la concentración de oxígeno disuelto y las condiciones de cultivo (temperatura, agitación) (Elibol y Ozer, 2000). Adicionalmente, es preciso establecer las condiciones óptimas de reacción de la enzima, y características tales como su estabilidad frente a pH, temperatura, etc. En este trabajo se han fijado unas condiciones tanto para la producción como para la cuantificación de la actividad enzimática debido a que constituye un estudio de rastreo que pretende establecer cuáles son las cepas que podrían ser de interés. Sin embargo, el ajuste de las condiciones de cultivo y de reacción de la enzima puede mejorar la producción en las cepas seleccionadas o incluso en aquellas cuya producción ha sido baja aunque detectable. Las investigaciones futuras se centraran en establecer las condiciones idóneas de producción de las enzimas, la caracterización de las mismas y el establecimiento de sus aplicaciones de acuerdo a sus características.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones:

1. La pila de compostaje constituye una fuente adecuada para la obtención de microorganismos lipolíticos.
2. En la colección de microorganismos lipolíticos analizados en este trabajo dominan las especies del género *Bacillus*.
3. Las bacterias lipolíticas *Bacillus altitudinis* 975, *Staphylococcus equorum* 557 y *Parapusillimonas granuli* 701 presentan un gran potencial para la producción de lipasas de interés ambiental e industrial.

6. Bibliografía

- Abad M, Noguera P, Puchades R, Maquieira A y Noguera V. (2002). Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Bioresource Technology* 82, 241-245.
- Anastasi A, Varese GC y Marchisio VF. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* 97, 33-44.
- Arora PK, Chauhan A, Pant B, Korpole S, Mayilraj S y Jain R K. (2011). *Chryseomicrobium imtechense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Planococcaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 1859-1864.
- Bailey JE y Ollis DF. (1986). Applied enzyme catalysis. En: *Biochemical Engineering fundamentals*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; pp. 157-227.
- Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL y Aragno M. (1996). Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1723-1727.
- Benjamin S, Pandey A. (1998). *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14, 1069-1087.
- Bertran E, Sort X, Soliva M y Trillas I. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology* 95, 203-208.
- BOE 170, de 14 de julio de 2010. Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos.
- BOE 181, de 29 de julio de 2011. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos.
- Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E y Riddle CF. (1993). Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 645-658.
- Cardenas, F, Alvarez E, De Castro-Alvarez MS, Sánchez-Montero JM, Elson S y Sinisterra JV. (2001). Three new lipases from actinomycetes and their use in organic reactions. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 315-329.
- Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology* 12, 251.
- Chandna P, Nain L, Singh S y Kuhad RC. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology* 13, 99.
- de Gannes V, Eudoxie G y Hickey WJ. (2013). Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. *Bioresource Technology* 133, 573-580.

- de Guardia A, Mallard P, Teglia C, Marin A, Le Pape C, Launay M y Petiot C. (2010). Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: Part 2, nitrogen dynamic. *Waste Management* 30, 415-425.
- Dees PM, y Ghiorse WC (2001). Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology* 35, 207-216.
- Diaz-Raviña M, Acea MJ y Carballas T. (1989). Microbiological characterization of four composted urban refuses. *Biological wastes* 30, 89-100.
- Dror A, Shemesh E, Dayan N y Fishman A. (2014). Protein engineering by random mutagenesis and structure-guided consensus of *Geobacillus stearothermophilus* lipase T6 for enhanced stability in methanol. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1515-1527.
- Elibol M y Ozer D. (2000). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry* 36, 325-329.
- Euzeby JP. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematics Bacteriology* 47, 590-592.
- Fan X, Niehus X y Sandoval G. (2012). Lipases as biocatalyst for biodiesel production. En: *Lipases and Phospholipases*. New York: Humana Press, pp. 471-483.
- Farnet AM, Qasemian L, Goujard L, Gil G, Guiral D, Ruaudel F y Ferre E. (2010). A modified method based on *p*-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 386-389.
- Fitzpatrick GE, Worden EC y Vendrame WA. (2005). Historical development of composting technology during the 20th century. *HortTechnology* 15, 48-51.
- Gopinath S, Hilda A y Ramesh VM. (1998). Detection of biodegradability of oils and related substances. *Journal of Environmental Biology* 19, 157-165.
- Guncheva M y Zhiryakova D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68, 1-21.
- Gupta R, Gupta N y Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 763-781.
- Hasan F, Shah AA y Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 235-251.
- Hernanz JL, López R, Navarrete L y Sánchez-Girón V. (2002). Long-term effects of tillage systems and rotations on soil structural stability and organic carbon stratification in semiarid central Spain. *Soil and Tillage Research* 66, 129-141.

- Horchani H, Aissa I, Ouertani S, Zarai Z, Gargouri Y y Sayari A. (2012). Staphylococcal lipases: biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76, 125-132.
- Houde A, Kademi A y Leblanc D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 155-170.
- Huang DY, Zhuang L, Cao WD, Xu W, Zhou SG y Li FB. (2010). Comparison of dissolved organic matter from sewage sludge and sludge compost as electron shuttles for enhancing Fe (III) bioreduction. *Journal of Soils and Sediments* 10, 722-729.
- Hun CJ, Rahman RNZA, Salleh AB y Basri, M. (2003). A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* 15, 147-151.
- Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T y Shrestha S. (2001). Production of biodiesel fuel from tricyclerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 53-58.
- Jaeger KE, Dijkstra BW y Reetz MT. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology* 53, 315-351.
- Jaeger KE y Eggert T. (2004). Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 305-313.
- Jurado M, López MJ, Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, López-González JA y Moreno J. (2014). Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology* 162, 283-293.
- Kim YJ, Kim MK, Im WT, Srinivasan S y Yang DC. (2010). *Parapusillimonas granuli* gen. nov., sp. nov., isolated from granules from a wastewater-treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1401-1406.
- Linko YY, Lamsa M, Wu X, Uosukainen E, Seppala J, Linko P.(1998) Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology* 66, 41-50.
- Lopez MJ, Elorrieta MA, Vargas-García, MC, Suarez-Estrella F y Moreno J. (2002). The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Bioresource Technology* 81, 123-129.
- Lotti M, Monticelli S, Luis Montesinos, J, Brocca S, Valero F y Lafuente J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids* 93, 143-148.
- Lyon PF, Beffa T, Blanc M, Auling G y Aragno M. (2000). Isolation and characterization of highly thermophilic xylanolytic *Thermus thermophilus* strains from hot composts. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1029-1035.
- Mahdi BA, Bhattacharya A y Gupta, A. (2012). Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87, 418-426.

- Margesin R, Labbe D, Schinner F, Greer CW y Whyte LG. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3085-3092.
- Miles AA, Misra SS y Irwin JO. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene* 38, 732-749.
- Moreno J y Mormeneo S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: *Compostaje* (Moreno J, Moral R, Eds.). Mundi Prensa, Madrid.
- Odeyemi AT, Aderiye BI, Adeyeye EI, Donbraye E y Faleye T. (2014). Lipolytic activity and molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Lysinibacillus sphaericus* isolated from domestic oil rich wastewater. *British Microbiology Research Journal* 4, 392-404.
- Partanen P, Hultman J, Paulin L, Auvinen P y Romantschuk M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology* 10, 94.
- Posorske LH. (1984). Industrial scale application of enzymes to the fat and oil's industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61, 1758-1760
- Rosenstein R y Götz F. (2000). Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* 82, 1005-1014.
- Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J y Swings J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology* 53, 349-410.
- Said-Pullicino D, Erriquens FG y Gigliotti G. (2007). Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresource Technology* 98, 1822-1831.
- Sarkar S, Sreekanth B, Kant S, Banerjee R y Bhattacharyya BC. (1998). Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering* 19, 29-32.
- Schloss PD y Handelsman J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biology* 6, 229.
- Segers P, Vancanneyt M, Pot B, Torck U, Hoste B, Dewettinck D y De Vos P. (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 499-510.
- Shah S, Sharma S, Gupta MN. (2004). Biodiesel preparation by lipase catalysed transesterification of Jatropha oil. *Energy Fuels* 2004; 18.
- Simons JW, Van Kampen MD, Riel S, Götz F, Egmond MR y Verheij HM (1998). Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*. *European Journal of Biochemistry* 253, 675-683.

- Tindall BJ, Rosselló-Mora R, Busse HJ, Ludwig W y Kämpfer P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 249-266.
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M y Oliveira JV. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology* 3, 182-196.
- Tuomela M, Vikman M, Hatakka A y Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72, 169-183.
- Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, López MJ y Moreno J. (2010). Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management* 30, 771-778.
- Vasileva-Tonkova E y Galabova D. (2003). Hydrolytic enzymes and surfactants of bacterial isolates from lubricant-contaminated wastewater. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 58, 87-92.
- Wiseman A. (1995). Introduction to principles. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3rd edn. Ellis Horwood Ltd/TJ Press Ltd, Padstow/Cornwall, 3-8.
- Yoon JH, Kang SJ, Im WT, Lee ST y Oh TK. (2008). *Chelatococcus daeguensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works, and emended description of the genus *Chelatococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2224-2228.